

Desarrollo de una prueba de susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* mediante el índice de ácidos micólicos

José M. Viader Salvadó^{*,**}, Rolando Tijerina Menchaca^{**}, Elvira Garza González^{**}, Martha Guerrero Olazarán^{*,**}

La tuberculosis (TB) es actualmente un problema de salud mundial. Su alta incidencia es parcialmente debida a la aparición de cepas multidrogaresistentes. Este problema se complica porque las pruebas de susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis*, usadas generalmente en los laboratorios clínicos, están basadas en el crecimiento del microorganismo en un medio sólido o líquido, en presencia o ausencia de la droga antituberculosa después de un mínimo de tres semanas de incubación, que es un tiempo muy largo para ajustarse a las recomendaciones propuestas por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos para un laboratorio micobacteriológico eficiente.¹ Por tal razón, las pruebas de susceptibilidad de *M. tuberculosis* rápidas son esenciales y deben de ser realizadas para un control eficiente de la tuberculosis. Actualmente están disponibles varias de estas pruebas rápidas.²

Los ácidos micólicos son β -hidroxiácidos- α -alquil ramificados de alto peso molecular componentes de la pared celular de microorganismos del género *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordonia*, *Tsukamurella* y *Mycobacterium*. Por lo tanto, la presencia de estos compuestos en una muestra clínica o en un cultivo aislado de ésta indica la presencia de un microorganismo de estos géneros. W.R. Butler y cols.³ desarrollaron un método para el análisis de derivados p-bromofenacólicos de ácidos micólicos empleando la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y lograron diferenciar los patrones cromatográficos de ácidos micólicos de los géneros *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia* y *Mycobacterium*. Posteriormente,⁴ esta-

blecieron un esquema de diferenciación de distintas especies micobacterianas mediante su patrón cromatográfico de ácidos micólicos. Adicionalmente, el grupo de usuarios de CLAR (HPLC users group) publicó una estandarización de este método de identificación de micobacterias⁵ y una colección de patrones estándares de ácidos micólicos.⁶ En 1995, K.C. Jost y cols.⁷ describieron una modificación de este método basado en el uso de una cumarina como agente derivatizante de ácidos micólicos, lo cual permitió la detección de micobacterias directamente de muestras clínicas.^{7,8}

Siendo los ácidos micólicos componentes bioquímicos de las micobacterias, si existiera una relación entre el contenido de ácidos micólicos (o de un parámetro fisicoquímico directamente proporcional al contenido de ácidos micólicos) de un cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* y las unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro del mismo cultivo obtenidas mediante el método tradicional de cuenta en placa, después de incubar un mínimo de tres semanas en medio Middlebrook 7H10, se podría utilizar el contenido de ácidos micólicos como estimador del crecimiento micobacteriano y utilizarlo en pruebas de susceptibilidad. Con esta hipótesis, en el presente trabajo se desarrolló y evaluó una prueba de susceptibilidad a antifímicos de *Mycobacterium tuberculosis* mediante un índice de ácidos micólicos (IAM).

* Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas.

** Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UANL. E-mail: jviader@ccr.dsi.uanl.mx

Estrategia experimental

Para cumplir con el objetivo propuesto en este trabajo, se plantearon dos etapas para el proyecto. En primer lugar, se realizó una correlación del contenido de ácidos micólicos (o de un parámetro físico-químico directamente proporcional al contenido de ácidos micólicos) de un cultivo de *M. tuberculosis* y las UFC/mL del mismo cultivo obtenidas mediante el método tradicional de cuenta en placa. En la segunda etapa se diseñó y evaluó en aislamientos clínicos, una nueva prueba de susceptibilidad a antifímicos de *M. tuberculosis* mediante el cambio del contenido de ácidos micólicos, al incubar en presencia y ausencia del antifímico.

Para realizar la primera etapa del proyecto, se cultivó una cepa testigo (*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra) para tener un suministro constante de microorganismos en la misma fase de crecimiento micobacteriano y se estandarizó el método de análisis de ácidos micólicos, con el fin de identificar los picos correspondientes a los ácidos micólicos y obtener una buena reproducibilidad en el área total de dichos picos cromatográficos. Se realizaron cinéticas de crecimiento micobacteriano en presencia y ausencia de antifímico (isoniacida y estreptomycin) evaluando el área total correspondiente a los picos cromatográficos de ácidos micólicos (ATAM) a través del tiempo. Los resultados obtenidos se validaron al comparar estas cinéticas evaluadas a través del ATAM con cinéticas de crecimiento evaluadas por cuenta en placa como UFC/mL. La comparación de las cinéticas de crecimiento micobacteriano en presencia y ausencia de antifímicos evaluadas mediante el ATAM permitió conocer a partir de qué día se observa la inhibición del desarrollo micobacteriano y concluir que la cepa empleada es susceptible a los antifímicos probados. Esta susceptibilidad se ratificó con el método indirecto de proporción.⁹

Posteriormente, en la segunda etapa del proyecto, se definió el IAM como la relación entre el aumento de la cantidad de ácidos micólicos de un cultivo en medio Middlebrook 7H9 a los cinco días en presencia del antifímico, respecto al valor inicial y el aumento de la cantidad de ácidos micólicos de un cultivo en medio Middlebrook 7H9 a los cinco días en ausencia del antifímico respecto al valor inicial. Se determinó el IAM a isoniácida y rifampicina de 200 aislamientos clínicos y dos cepas control

(H37Ra y H37Rv). Los resultados obtenidos se compararon con el porcentaje de resistencia a isoniácida y rifampicina de las muestras en estudio y las cepas control evaluado mediante el método indirecto de proporción⁹ y siguiendo las recomendaciones del Comité Nacional de estándares para Laboratorios Clínicos (NCCLS) de Estados Unidos.¹⁰

Resultados y discusión

Correlación del contenido de ácidos micólicos de un cultivo de Mycobacterium tuberculosis y las unidades formadoras de colonia por mL

Una vez estandarizado y aceptado el método de análisis de ácidos micólicos por CLAR, se inició el estudio cinético en ausencia y presencia de antifímico.

Se correlacionaron los valores de UFC/mL y el ATAM correspondientes a cada uno de los días analizados, realizando un ajuste matemático a una curva exponencial ($r^2 = 0.95$, $p < 0.001$). Esta relación se ratificó con la relación lineal ($r^2 = 0.98$, $p < 0.001$) obtenida en la gráfica semilogarítmica de UFC/mL vs ATAM, e indica que el logaritmo de UFC/mL es directamente proporcional al ATAM y por lo tanto es posible calcular las UFC/mL de una suspensión micobacteriana a partir del ATAM determinado por CLAR. Esto representa una disminución en el tiempo necesario para analizar una muestra, ya que con el método de cuenta en placa se requiere de un tiempo mínimo de tres semanas y para la determinación del ATAM por CLAR se requiere sólo de cuatro horas.

La figura 1 presenta la superposición de las gráficas del logaritmo de UFC/mL vs tiempo y el ATAM vs tiempo, los resultados experimentales se ajustaron a ecuaciones sigmoidales ($r^2 = 0.97$ y 1.00 , respectivamente; $p < 0.001$). Considerando el logaritmo de UFC/mL vs tiempo, se ubicaron las fases lag, exponencial y estacionaria del crecimiento micobacteriano. En la fracción de la curva entre el día 0 al día 6 se observó un ligero incremento entre el logaritmo de UFC/mL (10.2%), que corresponde a la fase lag de la cinética de crecimiento. En esta fase los microorganismos se adaptan al medio ambiente. En la curva de ATAM vs tiempo se observó un mayor incremento del ATAM (20,800%) que el incremento observado en la curva de logaritmo de UFC/mL, indicando que aunque la reproducción

celular es mínima, hay producción de ácidos micólicos. Del día 6 al día 13 se aprecia en ambas gráficas una relación lineal con pendientes similares (0.09 y 0.11, respectivamente), y corresponde a la fase exponencial. Estos resultados indican que los incrementos por unidad de tiempo en el logaritmo de UFC/mL y en ATAM son constantes y similares, por lo tanto, si se analizan como reacciones de primer orden, las constantes de velocidad son similares. En esta fase hay un aumento exponencial en el número de células y se alcanza una etapa estable del metabolismo. A partir del día 13 se apreció un aumento discreto en el ATAM (18.9%) a pesar que las UFC/mL permanecían constantes, ya que corresponde a la fase estacionaria. En esta fase hay un aumento muy pequeño en la cantidad de células, esto se ve determinado fundamentalmente por la variación de pH del medio, agotamiento de nutrientes y acumulación de productos de desecho.

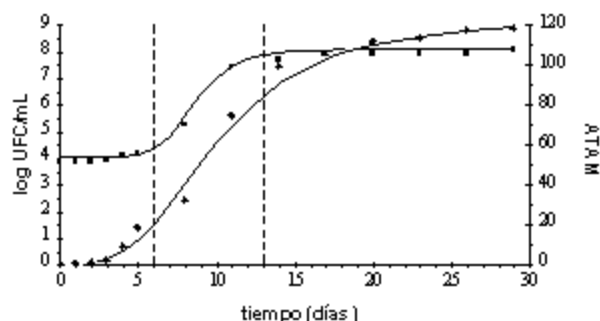


Fig. 1. Variación del log UFC/mL vs tiempo (■) y ATAM vs tiempo (◆) en los ensayos cinéticos realizados en ausencia de antifímicos. Cada punto es la media de tres ensayos y las curvas representan los ajustes matemáticos a ecuaciones sigmoidales.

Con el fin de determinar si era posible detectar la inhibición del crecimiento micobacteriano determinando el ATAM por CLAR, se realizó una cinética de crecimiento en las mismas condiciones que la cinética anterior pero en presencia de antifímico. Además, esta cinética se llevó a cabo mediante la determinación de las UFC/mL.

La gráfica superior de la figura 2 presenta la variación del logaritmo de UFC/mL vs tiempo y ATAM vs tiempo en presencia de isoniácida. Del día 0 al 4 se aprecia una disminución en el logaritmo de UFC/mL y permanece constante a partir del cuarto día. Del día 0 al 3 se aprecia aumento en el

ATAM, a partir del tercer día no hay variación. Se realizó una prueba t de Student asumiendo igualdad de varianzas para comparar las medias de los resultados obtenidos en presencia y ausencia de isoniácida para cada día y se obtuvieron diferencias significativas con $p < 0.01$ a partir del tercer día. Por lo tanto, a partir del tercer día las cinéticas de crecimiento son diferentes.

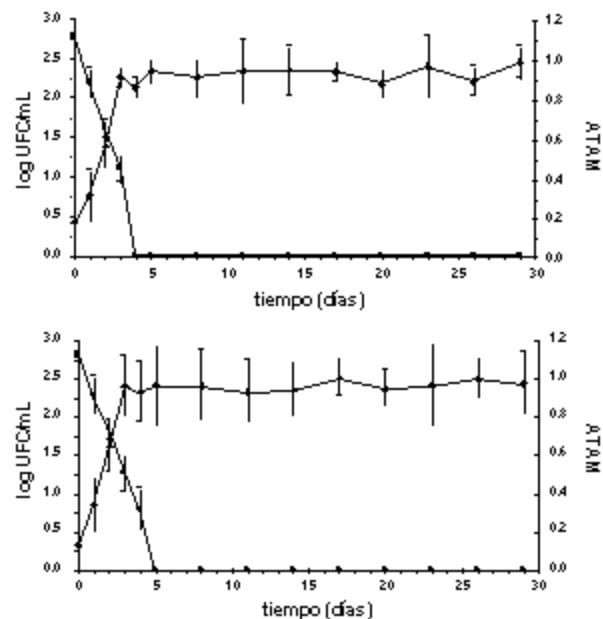


Fig. 2. Variación del logaritmo de UFC/mL vs tiempo (■) y ATAM vs tiempo (◆) de los ensayos cinéticos realizados en presencia de isoniácida (gráfica superior) o estreptomycina (gráfica inferior). Los puntos representan la media la desviación estándar de la media ($n = 3$).

La gráfica inferior de la figura 2 muestra la variación del logaritmo de UFC/mL vs tiempo y ATAM vs tiempo en presencia de estreptomycina. Del día 0 al 5 hay una disminución en el logaritmo de UFC/mL y no hay variación a partir del quinto día. El ATAM se incrementó del día 0 al 3 y a partir del tercer día permaneció constante. De forma similar a como se evaluaron los resultados de la cinética de crecimiento en presencia de isoniácida, se obtuvieron diferencias significativas con $p < 0.01$ entre las cinéticas en presencia y ausencia de estreptomycina a partir del cuarto día.

Los resultados obtenidos indican que es posible detectar la inhibición del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en presencia de isoniácida o estreptomycina por CLAR en tres y cua-

tro días respectivamente, mientras que para el método tradicional de cuenta en placa se requiere de al menos tres semanas para obtener los resultados de susceptibilidad.

Prueba de susceptibilidad mediante el índice de ácidos micólicos

La figura 3 muestra cuatro cromatogramas del patrón cromatográfico de ácidos micólicos de uno de los aislamientos clínicos obtenidos antes de la incubación (figura 3A), a los cinco días de incubación en ausencia de antifímico (figura 3B), a los cinco días de incubación en presencia de isoniácida (figura 3C) y a los cinco días de incubación en presencia de rifampicina (figura 3D). Es de notar que sólo la cepa incubada por cinco días en ausencia de antifímico presentó una cantidad notable de ácidos micólicos. Esto indica de forma cualitativa que la cepa proveniente de este aislamiento se trata de una cepa susceptible a las dos drogas evaluadas. Cuando se empleó un aislamiento clínico resistente a isoniácida y/o rifampicina, se detectó claramente una cantidad notable de ácidos micólicos tanto en la muestra obtenida después de incubar cinco días en ausencia de antifímico como en la muestra obtenida después de incubar cinco días en presencia del antifímico al que era resistente.

Para realizar esta prueba de susceptibilidad de forma cuantitativa se empleó el IAM. Los resultados de susceptibilidad mostraron que 82 de los 84 aislamientos clínicos resistentes a isoniácida presentaron un IAM a este antifímico mayor de 0.5, todos los aislamientos clínicos resistentes a rifampicina presentaron un IAM a este antifímico mayor de 0.30 y todas las cepas susceptibles a estas drogas mostraron un IAM menor de 0.10 y 0.15, respectivamente, indicando que se puede utilizar el IAM para determinar la susceptibilidad a antifímicos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de aislamientos clínicos. Los dos aislamientos clínicos que no mostraron una concordancia entre ambos métodos podría ser debido a una mala interpretación del porcentaje de resistencia, ya que el valor obtenido para estos dos aislamientos clínicos estuvo muy próximo al valor de corte de susceptibilidad y resistencia (1.1 y 2.3%, respectivamente). Con estos resultados, se consideró un aislamiento clínico de *M. tuberculosis* susceptible a isoniácida si el IAM fue menor o igual a 0.15. Una interpretación

similar se hizo para rifampicina. Además, se evaluó la reproducibilidad del método de susceptibilidad del IAM usando tres aislamientos clínicos y evaluándolos tres veces, obteniendo un coeficiente de variación menor del 5%.

En la primera parte de este trabajo se demostró que la susceptibilidad de *M. tuberculosis*, específicamente con la cepa *M. tuberculosis* H37Ra, se puede determinar rápidamente mediante el análisis de ácidos micólicos. Ahora, los resultados del método de susceptibilidad del IAM que aquí se describen se obtienen claramente en cinco días después de incubar el aislamiento clínico en presencia o ausencia de una droga antituberculosa. El método de susceptibilidad del IAM se basa en la habilidad de *M. tuberculosis* de sintetizar ácidos micólicos durante el crecimiento. En micobacterias no viables o susceptibles a drogas antituberculosas, se reduce la síntesis de nuevos ácidos micólicos debido a la ausencia o disminución de la actividad metabólica de los microorganismos. Se emplearon 200 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* para determinar su susceptibilidad o resistencia a isoniácida y rifampicina por el método de susceptibilidad del IAM y el método indirecto de proporción. Se obtuvo una concordancia entre los dos métodos en 398 de los 400 pruebas realizadas (99.5%). Específicamente, la sensibilidad del método del IAM para isoniácida y rifampicina fue del 97.6 y 100%, respectivamente. La especificidad y el valor predictivo positivo fue del 100% para ambos antifímicos y el valor predictivo negativo para isoniácida y rifampicina fue del 98.3 y 100%, respectivamente.

Además de la rapidez y objetividad del método de susceptibilidad del IAM y que el uso del análisis de ácidos micólicos está aumentando,^{5,6} una ventaja de este método es su habilidad de confirmar la identificación de *M. tuberculosis* y el diagnóstico de TB del paciente. Sin embargo, aunque la prueba es rápida, exacta y reproducible, muchos laboratorios clínicos no tienen la infraestructura para realizar el procedimiento. No obstante, la prueba puede ser utilizada por laboratorios públicos de salud o laboratorios de referencia grandes que posean un laboratorio de nivel tres de bioseguridad. A pesar del alto costo de un cromatógrafo de líquidos, este equipo se puede usar tanto para la identificación de micobacterias como para el método de susceptibilidad del IAM, lo cual compensa el costo del equipo. Además, los reactivos y consumibles cromato-

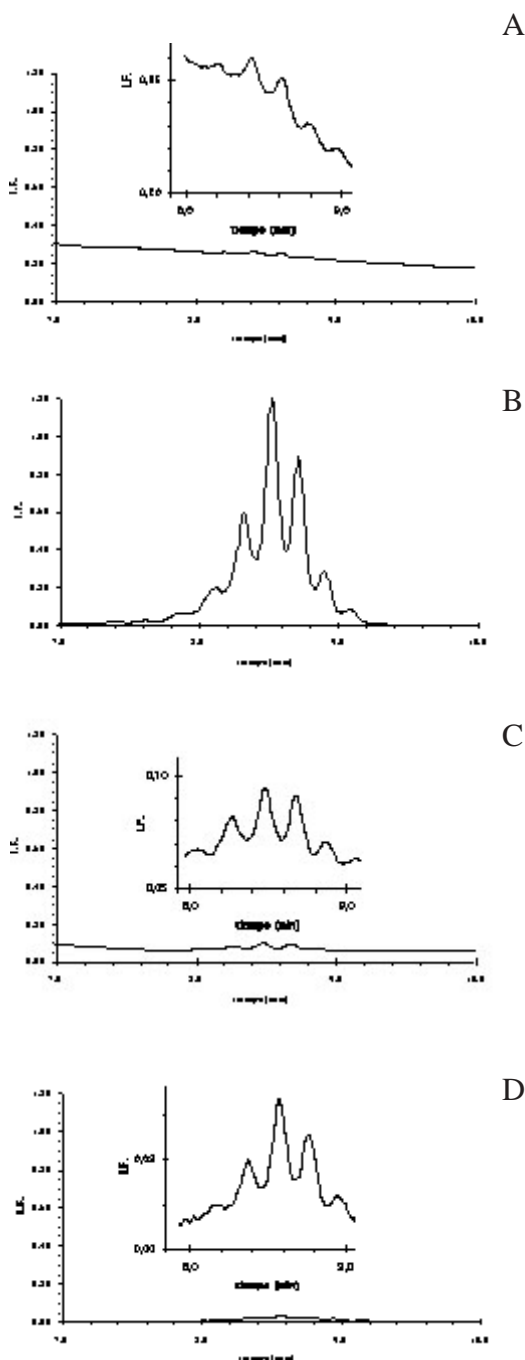


Fig. 3. Patrón cromatográfico de ácidos micólicos de uno de los aislamientos clínicos obtenido antes de la incubación (A), a los cinco días de incubación en ausencia de antituberculoso (B), a los cinco días de incubación en presencia de isoniacida (C) y a los cinco días de incubación en presencia de rifampicina (D). Los cuatro cromatogramas están en la misma escala con una ampliación en la zona de interés.

gráficos son de bajo costo comparados con otros métodos de susceptibilidad rápidos como el método radiométrico Bactec (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md.) o métodos para detectar mutaciones en genes específicos.^{2,11} Ya que actualmente se puede hacer el análisis de ácidos micólicos directamente de cultivos jóvenes^{7,12} el método de susceptibilidad del IAM se podría realizar en una forma directa en lugar de la forma indirecta que aquí se describe. Además, el método de susceptibilidad del IAM podría ser usado junto con otra técnica analítica que pudiera determinar la cantidad de ácidos micólicos en cultivos de *M. tuberculosis*.

En conclusión el método de susceptibilidad del IAM que aquí se describe se puede usar para realizar pruebas de susceptibilidad de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* mostrando ser un método prometedor, rápido, efectivo y exacto de susceptibilidad para un laboratorio micobacteriológico.

Agradecimientos

Agradecemos los apoyos económicos del Sistema de Investigación Alfonso Reyes (No. 970402004), Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT, No. SA093-98 parte I y II) de la UANL y de la Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León, así como al Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González y al Laboratorio Estatal de Salud de los Servicios de Salud de Nuevo León por proporcionar muestras, y la TLC María de la Luz Acevedo Duarte por el apoyo técnico brindado.

Resumen

En el presente trabajo se desarrolló un método para determinar la susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a drogas antituberculosas determinando niveles de ácidos micólicos por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Se encontró una relación lineal entre el logaritmo de las unidades formadoras de colonia por mililitro y el área total correspondiente a los picos cromatográficos de ácidos micólicos (ATAM), y se observó que es posible detectar la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* por drogas antituberculosas usando CLAR. Con estos resultados, se propuso y evaluó una prueba rápida de susceptibilidad de *M. tuberculosis* a isoniacida y rifampicina usando aislamientos clí-

cos y un índice de ácidos micólicos (IAM). Se determinó la susceptibilidad o resistencia a isoniácida y rifampicina de 200 aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* por los métodos del IAM e indirecto de proporción. Se obtuvo una concordancia entre los dos métodos en 398 de los 400 pruebas realizadas (99.5%). La sensibilidad del método del IAM para isoniácida y rifampicina fue del 97.6 y 100%, respectivamente. La especificidad y el valor predictivo positivo fue del 100% para ambos antifímicos. En conclusión el método de susceptibilidad del IAM aquí descrito se puede usar para determinar rápidamente la susceptibilidad a drogas de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* en cinco días después que el aislamiento clínico se incubaba en presencia o ausencia de la droga antituberculosa.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, Pruebas de susceptibilidad, Índice de ácidos micólicos, Isoniácida, Rifampicina.

Abstract

A method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to antituberculosis drugs by determining levels of mycolic acids by high-performance liquid chromatography (HPLC) was developed. A linear relationship between the logarithm of colony formation units per milliliter and the total area corresponding to mycolic acid peaks (TAMA) was found and the possibility to detect growth inhibition of *M. tuberculosis* by antituberculosis drugs using HPLC was observed. With these results, a rapid drug susceptibility test of *M. tuberculosis* to isoniazid and rifampin using clinical isolates and a newly defined mycolic acid index (MAI) was proposed and evaluated. Two-hundred clinical isolates of *M. tuberculosis* were tested for susceptibility or resistance to both drugs by the MAI susceptibility and indirect proportion methods. There was agreement between the two methods for 398 of the 400 total tests (99.5%). The sensitivity of the MAI susceptibility method for isoniazid and rifampin was 97.6 and 100%, respectively. The specificity and positive predictive value was 100% for both drugs and the negative predictive value for isoniazid and rifampin was 98.3 and 100%, respectively. In conclusion, the MAI susceptibility method described here can be used for rapid drug susceptibility testing of *M. tuberculosis* clinical isolates within 5 days after clinical

isolates are incubated in presence or absence of an antituberculosis drug.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Drug susceptibility tests, Mycolic acid index, Isoniazid, Rifampin.

Referencias

1. Tenover, F.C., J.T. Crawford, R.E. Huebner, L.J. Geiter, C.R. Horsburgh, Jr., R.C. Good. 1993. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J. Clin. Microbiol.* 31:767-770
2. Viader-Salvadó, J.M., M. Guerrero-Olazarán, R. Tijerina-Menchaca, E. Garza-González, C.M. Luna-Aguirre, J.M. Reyes-Ruiz. 1998. Nuevas alternativas en el diagnóstico de la tuberculosis. *CIENCIA UANL* 1(2): 119-127.
3. Butler, W.R., D.G. Ahearn. 1986. High-performance liquid chromatography of mycolic acids as a tool in the identification of *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, and *Mycobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* 23:182-185.
4. Butler, W.R., K.C. Jost, Jr., J.O. Kilburn. 1991. Identification of *Mycobacteria* by high-performance liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.* 29:2468-2472.
5. Butler W.R., M.M. Floyd, V. Silcox, G. Cage, E. Desmond, P.S. Duffey, L.S. Guthertz, W. Gross, K.C. Jost, L.S. Ramos, L. Thibert, N. Warren. 1996. Eds. Steering Committee, HPLC Users Group. Standardized method for HPLC identification of mycobacteria. U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.
6. Butler, W. R., M. M. Floyd, V. Silcox, G. Cage, E. Desmond, P. S. Duffey, L. S. Guthertz, W. Gross, K. C. Jost, L. S. Ramos, L. Thibert, N. Warren. Eds. Steering Committee, HPLC Users Group. 1999. Mycolic acid pattern standards for HPLC identification of mycobacteria. Washington, D.C., U.S. Department of Health and Human Services.
7. Jost Jr., K.C., D.F. Dunbar, S.S. Barth, V.L. Headley, L.B. Elliott. 1995. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* complex from smear-positive sputum specimens and BACTEC 12B cultures by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and computer-driven pattern

- recognition models. J. Clin. Microbiol. 37:1270-1277.
8. Garza-González, E., M. Guerrero-Olazarán, R. Tijerina-Menchaca, J.M. Viader-Salvadó. 1998. Identification of mycobacteria by mycolic acid pattern. Arch. Med. Res. 29:303-306.
 9. Kent, P.T., G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory, U.S. Department of Health and Human Services publication no. 86-8230. U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.
 10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1995. Antimycobacterial susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*. Proposed standard M24-T. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
 11. Viader-Salvadó, J.M., C.M. Luna-Aguirre, J.M. Reyes-Ruiz, R. Valdez-Leal, M.A. del Bosque-Moncayo, R. Tijerina-Menchaca, M. Guerrero-Olazarán. 2003. Frequency of mutations in *rpoB* and codons 315 and 463 of *katG* in rifampin- and/or isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northeast Mexico. Microb. Drug Resist. En impresión.
 12. Molina-Torres C.A. Evaluación de una prueba para la detección de micobacterias directamente de muestras de esputo y/o cultivos jóvenes. Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología Médica. Facultad de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, N.L. (México). Mayo 2002.